



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 43 234 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
C 12 N 5/02

②1 Aktenzeichen: 198 43 234.8
②2 Anmeldetag: 9. 9. 1998
④3 Offenlegungstag: 23. 3. 2000

DE 198 43 234 A 1

⑦1 Anmelder:
Institut für Pflanzengenetik und
Kulturpflanzenforschung, 06466 Gatersleben, DE

⑦2 Erfinder:
Wobus, Anna M., Dr., 06466 Gatersleben, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
J. Mol. Cell. Carchiol. 29, S. 1525-39;
Dev. Biol. 197(2), S. 422-39, 1995;
J. Cell. Sci. 109(13) S. 2989-2999, 1996;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Differenzierte Herzzellen mit pathologischen Merkmalen als in vitro-Modell für Herzerkrankungen

⑤7 Die Erfindung betrifft Herzzellen mit pathologischen Merkmalen, ihre Entwicklung aus embryonalen Stammzelllinien und ihre Verwendung, insbesondere als vitro-Modell für Herzerkrankungen (z. B. Arrhythmie, Hypertrophie, Ischämie). Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Pharmakologie und die Medizin (Kardiophysiologie). Die Erfindung hat zum Ziel, durch geeignete Wahl der Differenzierungsbedingungen Zelllinien mit pathologischen Merkmalen zu gewinnen, die für spezifische Anwendungen in der Pharmakologie (Screening von Wirkstoffen) und der Medizin (Entwicklung von Therapiestrategien) dienen können.
Differenzierte Herzzellen aus embryonalen Stammzelllinien als in vitro-Modell für Herzerkrankungen (Arrhythmie, Hypertrophie, Ischämie) werden gemäß der Erfindung durch embryoid body Differenzierung von ES-Zellen, EC-Zellen oder EG-Zellen von Vertebraten (einschließlich des Menschen) in der Massenkultur ('mass culture'), im hängenden Tropfen ('hanging drop') oder mit Hilfe anderer Verfahren erhalten, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß während der Differenzierung Agenzien zugesetzt oder Kulturbedingungen gewählt werden, die das normale Differenzierungsprogramm dahingehend verändern, daß ein verändertes Entwicklungsprogramm aktiviert wird, so daß Herzzellen differenziert werden, die pathologische Merkmale aufweisen.

BEST AVAILABLE COPY

DE 198 43 234 A 1

Die Erfindung betrifft Herzzellen mit pathologischen Merkmalen, ihre Entwicklung aus embryonalen Stammzelllinien und ihre Verwendung, insbesondere als in vitro-Modell für Herzerkrankungen (z. B. Arrhythmie, Hypertrophie, Ischämie). Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Pharmakologie und die Medizin (Kardiophysiologie).

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen), embryonale Karzinomzellen (EC-Zellen) und embryonale Keimzellen (aus primordialen Keimzellen etablierte EG-Zellen) differenzieren, wenn sie in dreidimensionalen Aggregaten, sogenannten "embryoid bodies" (EBs) kultiviert werden, in funktionelle Herzzellen in vitro. Es handelt sich bei diesen ES-, EC- oder EG-Zellen um permanente Zelllinien, die sich durch Eigenschaften undifferenzierter embryonaler Zellen auszeichnen und die nach Entwicklung in der Zellkultur funktionelle Eigenschaften differenzierter Zellen ausprägen.

Für aus ES-Zellen differenzierte Herzzellen konnte nachgewiesen werden, daß diese im Hinblick auf Genexpression und funktionelle Eigenschaften den spezialisierten Zellen des Atriums, des Ventrikels und des Schrittmacherzentrums entsprechen. Die Herzzellen reagieren mit charakteristischen chronotropen Effekten auf kardiotope Agenzien (Wobus et al. 1991, Differentiation (1991) 48: 173-182; Wobus et al., In vitro Cell. Dev. Biol. 1994, 425 [siehe Patentschrift DD 299 439/B5]). Ein kürzlich entwickeltes Verfahren ermöglicht die computergestützte Erfassung chronotroper Effekte für Routineuntersuchungen pharmakologischer Eigenschaften von herzaktiven Verbindungen (Pich et al., Bioforum 20: 536-540, 1997).

Die Wahl der Kulturbedingungen bestimmt die Effizienz der Herzzelldifferenzierung sowie das Differenzierungsmuster, d. h., durch exogene Einflüsse kann das Differenzierungsprogramm moduliert und die Differenzierungsinduktion in einen bestimmten Herzzelltyp erreicht werden. So wurde z. B. für die spezifische Induktion in ventrikuläre Zellen die zeitabhängige Behandlung mit einer bestimmten Konzentration des Differenzierungsinduktors Retinsäure (RA) als effektive Differenzierungsinduktion ermittelt (Wobus et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 29, 1525-39, 1997).

Die Erfindung hat zum Ziel, durch geeignete Wahl der Differenzierungsbedingungen Zelllinien mit pathologischen Merkmalen zu gewinnen, die für spezifische Anwendungen in der Pharmakologie (Screening von Wirkstoffen) und der Medizin (Entwicklung von Therapiestrategien) dienen können.

Die Erfindung wird gemäß den Patentansprüchen realisiert, das zu schützende Verfahren zeichnet sich durch folgende Schritte aus:

1. ES-Zellen, EC-Zellen oder EG-Zellen von Vertebraten werden in an sich bekannter Weise in embryoähnlichen Aggregaten, den sogenannten "embryoid bodies" (EBs) differenziert. Dabei spielt es keine Rolle, ob die embryoid body-Differenzierung in der Massenkultur ("mass culture") oder in anderen Kulturverfahren, z. B. im hängenden Tropfen, erfolgt.

2. Während der Differenzierung werden gemäß der Erfindung Agenzien zugesetzt oder Kulturbedingungen gewählt, die das normale Differenzierungsprogramm dahingehend verändern, daß ein verändertes Entwicklungsprogramm aktiviert wird, so daß Herzzellen differenziert werden, die pathologische Merkmale entwickeln. Durch Wahl bestimmter Induktoren (z. B. extrazelluläre Matrixfaktoren und/oder Wachstumsfaktoren) können z. B. vorwiegend Schrittmacherzellen mit arrhythmischen Aktionspotentialen differenziert werden. Andere Versuchsbedingungen können zur Entwicklung vorwiegend von Herzzellen mit Eigenschaften hypertropher Zellen führen, eine Entwicklung, die z. B. mit einer Reaktivierung der Expression fetaler Gene verbunden ist.

3. Die EBs werden nach einer geeigneten Zeit, in der Regel nach 5 bis 7 Tagen der Suspensionskultur, auf adhäsive Unterlagen gebracht, wo sie anheften und neben epithelialen und anderen Zellen Areale spontan pulsierender Herzzellen auswachsen.

4. Zur Entwicklung von arrhythmisch schlagenden Herzzellen aus ES-Zellen (es kann jede beliebige ES-Zelllinie eingesetzt werden) wurde die Behandlung der differenzierenden EBs erfindungsgemäß mit einem komplexen Gemisch aus extrazellulären Matrixproteinen und Wachstumsfaktoren (MATRIGEL) nach dem folgenden Verfahren eingesetzt. Dabei kann jedes Verfahren der EB-Differenzierung eingesetzt werden, das eine genügend hohe Ausbeute an spontan schlagenden Herzzellen ergibt (siehe Anmerkung unter 1):

Versuchablauf zur Entwicklung arrhythmisch pulsierender Herzzellen, schematisch dargestellt in **Abb. 1** mit einem gewählten Beispiel von 5 Tagen der EB-Differenzierung und Plattierung.

a) ES-Zellen (z. B. n = 600 Zellen) der Linie R1 oder anderer ES-, EC- oder EG-Zelllinien werden im hängenden Tropfen in 20 µl Differenzierungsmedium für die Dauer von 2-3 Tagen und anschließend für die Dauer von 2 bis 6 Tagen (in der Regel von 3-4 Tagen) in Suspensionskultur in bakteriologischen Petrischalen kultiviert. ISCOVE-Medium (Gibco, BRL) wird mit L-Glutamin, nichtessentiellen Aminosäuren, Monothioglycerol und 20% fötalem Kälberserum supplementiert. Es ist prinzipiell jedes Medium geeignet, das eine genügend hohe Ausbeute an spontan pulsierenden Herzzellen ergibt.

b) 5 bis 7 Tage alte EBs (in der Regel werden 5 Tage alte EBs plattiert) werden auf Gewebekulturschalen plattiert, die vorher mit 10 µg/ml Matrigel (z. B., MATRIGEL® "Brand", = basement membrane matrix, Collaborative Biomedical Products) beschichtet wurden. Das eingesetzte Matrigel hat im einzelnen die folgende Zusammensetzung:

Zusammensetzung von Matrigel

Komponente	MATRIGEL Matrix	
Laminin (mg/mg Protein)	0,81	5
Collagen IV (mg/mg Protein)	0,45	
Heparan Sulfate	0,025	
Proteoglycan (mg GAG/mg Protein)		
Entactin (mg/mg Protein)	0,12	
EGF (ng/ml)	0,5-1,3	10
IGF-1 (ng/ml)	15,6	
PDGF (pg/ml)	12	
NGF (ng/ml)	<0,2	
TGF-beta (ng/ml)	2,3	
% Protein-Gel	80	15

Nach wenigen Tagen der Kultur wachsen differenzierte Zellen, einschließlich spontan pulsierender Herzzellen, aus den EBs aus.

c) Die Matrigel-Behandlung wird als Übersichtung ("overlay") während der folgenden Kulturtage im Abstand von 1 bis 3 Tagen bis zu 4 mal wiederholt. Dabei wird das Medium entfernt und frisches Differenzierungsmedium, das Matrigel enthält, den Kulturen zugesetzt. Bereits eine einmalige Gabe von Matrigel führte zu einer Erhöhung der Herzzell-Differenzierung, einem verlängerten Zeitmuster schlagender Herzzellen im Differenzierungsverlauf sowie zu einer Zunahme des Anteils arrhythmisch pulsierender Herzzellen, im Vergleich zu solchen Kulturen, die ohne Matrigel kultiviert wurden (= Kontrolle). Eine viermalige wiederholte Gabe von Matrigel erhöhte die Effizienz der Herzzelldifferenzierung sowie den Anteil arrhythmisch pulsierender Herzzellen im Vergleich zur Kontrolle. So sind in den Matrigel-behandelten Kulturen 26 Tage nach Plattierung 5 Tage alter embryoid bodies (= 5 + 26d, siehe Abb. 2) 45,0% arrhythmisch pulsierende Areale vorhanden, während in den Kontrollen nur 12,5% arrhythmisch pulsierende Areale – bei wesentlich geringerer Herzzelldifferenzierungseffizienz (siehe Abb. 2) – vorhanden sind.

Während in den Kontrollzellen der Anteil an spontan schlagenden Herzzellen etwa am Tag 36 nach Plattierung 5 Tage alter EBs gegen Null geht, enthalten die Matrigel-induzierten Kulturen in etwa 60 bis 70% der EBs spontan schlagende Areale mit Herzzellen, d. h., es sind noch Zellen mit Schrittmacheraktivität vorhanden. Diese Zellen zeigen jedoch vorwiegend arrhythmische Aktionspotentiale mit z. T. hohen Pulsations-Frequenzen.

Obwohl in den Kontrollkulturen auch einzelne Areale spontan pulsierender Herzzellen arrhythmische Pulsationsfrequenzen zeigen, ergibt erst die Matrigel-Induktion die für die Screeninguntersuchungen der pharmakologischen Wirkung von Anti-Arrhythmika erforderliche Anzahl von arrhythmisch schlagenden Herzzellen.

d) In Versuchen mit isolierten Herzzellen konnte gezeigt werden, daß Matrigel den Anteil der Zellen mit Schrittmacheraktivität signifikant erhöhte und die Differenzierung in spezialisierte Herzzellformen hemmte, so daß der Induktion von Herzzellen in arrhythmisch pulsierende Herzzellen durch Matrigel offenbar eine fehlerhafte Entwicklung der Zellen mit Schrittmacheraktionspotentialen (pacemaker action potentials) zugrundeliegt, d. h., es differenzieren offensichtlich weniger Zellen in spezialisierte Herzzellen, z. B. Ventrikelzellen.

e) die Erfassung der Schlagfrequenz erfolgt mit Hilfe des Imaging-Systems LUCIA "Heart" (Nikon). Dabei werden Helligkeitsunterschiede in Frequenzmuster überführt und die Werte computergestützt digitalisiert und erfaßt.

f) die Matrigel-induzierten Herzzellen werden dann eingesetzt, um die Wirksamkeit von Anti-Arrhythmika zu untersuchen. Dabei entspricht das Vorgehen prinzipiell dem im Patent DD 299 439/B5 beschriebenen Verfahren einer kumulativen Wirkstoffzugabe und einer Messung der die Schlagfrequenz normalisierenden Effekte mit Hilfe des Imaging-Verfahrens (siehe Abb. 3 und 4).

Damit steht erstmals ein Herzzellmodell zur Verfügung, das geeignet ist, die Wirkung von Anti-Arrhythmika in vitro zu testen.

Darüber hinaus kann das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden, um andere pathologische Veränderungen in den differenzierten Herzzellen zu erzielen, um daraus weitere in vitro-Modelle für Herzkrankheiten zu entwickeln: Die exogene Gabe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Hormonen auf differenzierende EBs bzw. die Überexpression in ES-Zellen von Genen, die TNF-alpha oder andere Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren oder Hormone kodieren, und nachfolgende Herzzelldifferenzierung kann zur Entwicklung von Herzzellen mit hypertrophen Eigenschaften führen, was mit einer Reaktivierung der Expression fetaler Gene (z. B. β -MHC, ANF, smooth muscle Aktin, c-fos, c-jun u. a. "immediate early genes") einhergeht.

Weiterhin können durch Unterversorgung mit Nährstoffen (Glukoseentzug) oder Sauerstoffmangel ischämische Reaktionen in den differenzierenden Herzzellen ausgelöst werden.

Das ES-Zelldifferenzierungsmodell pathologischer Herzzellen ist geeignet, im Vorfeld der Etablierung von Therapie-strategien für ischämische Veränderungen kardiovaskulärer (aber auch neuronaler) Gewebe und Organe oder von hypertrophen Herzzellen die Bedeutung intrazellulärer Signalwege zu analysieren und effiziente Behandlungsstrategien für den Einsatz am Menschen zu erarbeiten.

Das Verfahren ist in der Zukunft besonders dann geeignet, wenn zur Herzzelldifferenzierung embryonale Stammzellen des Menschen, die z. B. aus primordialen Keimzellen etabliert werden können, eingesetzt werden.

Patentansprüche

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

1. Differenzierte Herzzellen aus embryonalen Stammzelllinien als in vitro-Modell für Herzerkrankungen (Arrhythmie, Hypertrophie, Ischämie) durch embryoid body Differenzierung von ES-Zellen, EC-Zellen oder EG-Zellen von Vertebraten (einschließlich des Menschen) in der Massenkultur ("mass culture"), im hängenden Tropfen ("hanging drop") oder mit Hilfe anderer Verfahren, **dadurch gekennzeichnet**, daß während der Differenzierung Agenzien zugesetzt oder Kulturbedingungen gewählt werden, die das normale Differenzierungsprogramm dahingehend verändern, daß ein verändertes Entwicklungsprogramm aktiviert wird, so daß Herzzellen differenziert werden, die pathologische Merkmale aufweisen.

2. Differenzierte Herzzellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß extrazelluläre Matrixfaktoren und Wachstumsfaktoren zugesetzt werden, die zu einem atypischen Entwicklungsverlauf der Herzzelldifferenzierung, verbunden mit der Differenzierung einer erhöhten Anzahl von Schrittmacherzellen und in der Folge zu Herzzellen mit arrhythmischen Aktionspotentialen führen.

3. Differenzierte Herzzellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch die exogene Gabe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Hormonen auf differenzierende EBs bzw. die Überexpression in ES-Zellen von Genen, die TNF-alpha, Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren oder Hormone kodieren, und nachfolgende Herzzelldifferenzierung dieser transgenen ES-Zellen vorwiegend Herzzellen mit hypertrophen Eigenschaften differenziert werden (Re-Expression fetaler Gene, z. B. beta-MHC, ANF, SM-Aktin, Aktivierung von c-fos, c-jun).

4. Differenzierte Herzzellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß durch Unterversorgung mit Nährstoffen (Glukoseentzug) oder Sauerstoffmangel Herzzellen mit Eigenschaften ischämischer Zellen differenziert werden.

5. Verfahren zur Herstellung differenzierter Herzzellen nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß nach an sich bekannten Verfahren erhaltene 5-7 Tage alte embryoid bodies auf Gewebekulturen plattiert werden, die vorher mit einem komplexen Gemisch aus extrazellulären Matrixproteinen und Wachstumsfaktoren (MATRIGEL) beschichtet wurden, und die Matrigelbehandlung während der folgenden Kulturtage im Abstand von 1-3 Tagen als Überschichtung wiederholt wird.

6. Verwendung der differenzierten Herzzellen nach Anspruch 1, 2 und 5 als in vitro-Modell für Arrhythmien, dadurch gekennzeichnet, daß potentielle Anti-Arrhythmika den pulsierenden Herzzellen kumulativ zugegeben werden und die die Schlagfrequenz betreffenden normalisierenden Effekte gemessen werden.

7. Verwendung der differenzierten Herzzellen nach Anspruch 1 und 3 als in vitro Modell zur Entwicklung von Therapiestrategien gegen kardiale Hypertrophie.

8. Verwendung der differenzierten Herzzellen nach Anspruch 1 und 4 als in vitro Modell zur Entwicklung von Therapiestrategien gegen Ischämie.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

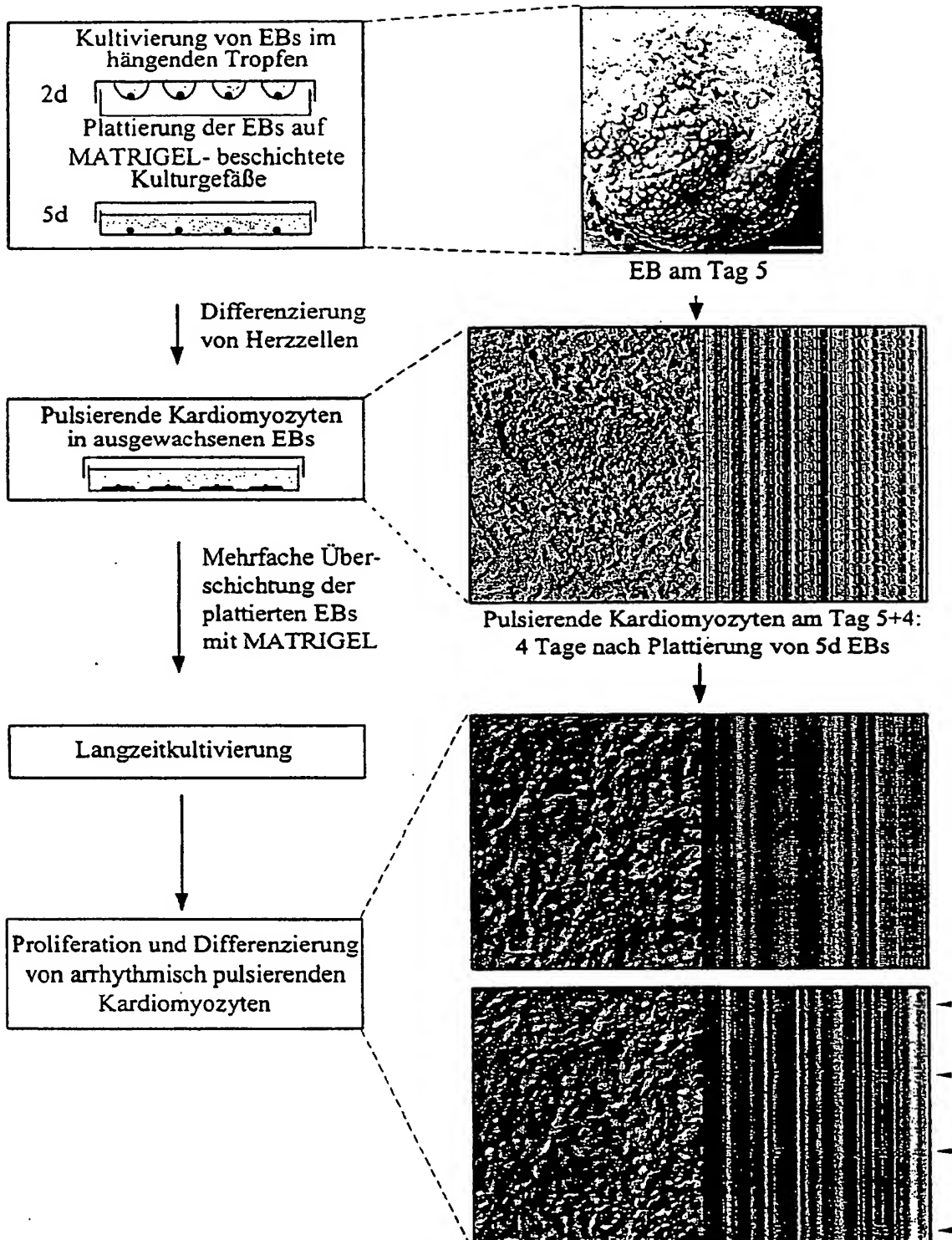


Abb. 1: Differenzierungs- und Induktionsschema von arrhythmisch pulsierenden Kardiomyozyten nach MATRIGEL- Induktion: 15 Tage nach Plattierung von 5 Tage alten embryoid bodies (5d EBs)

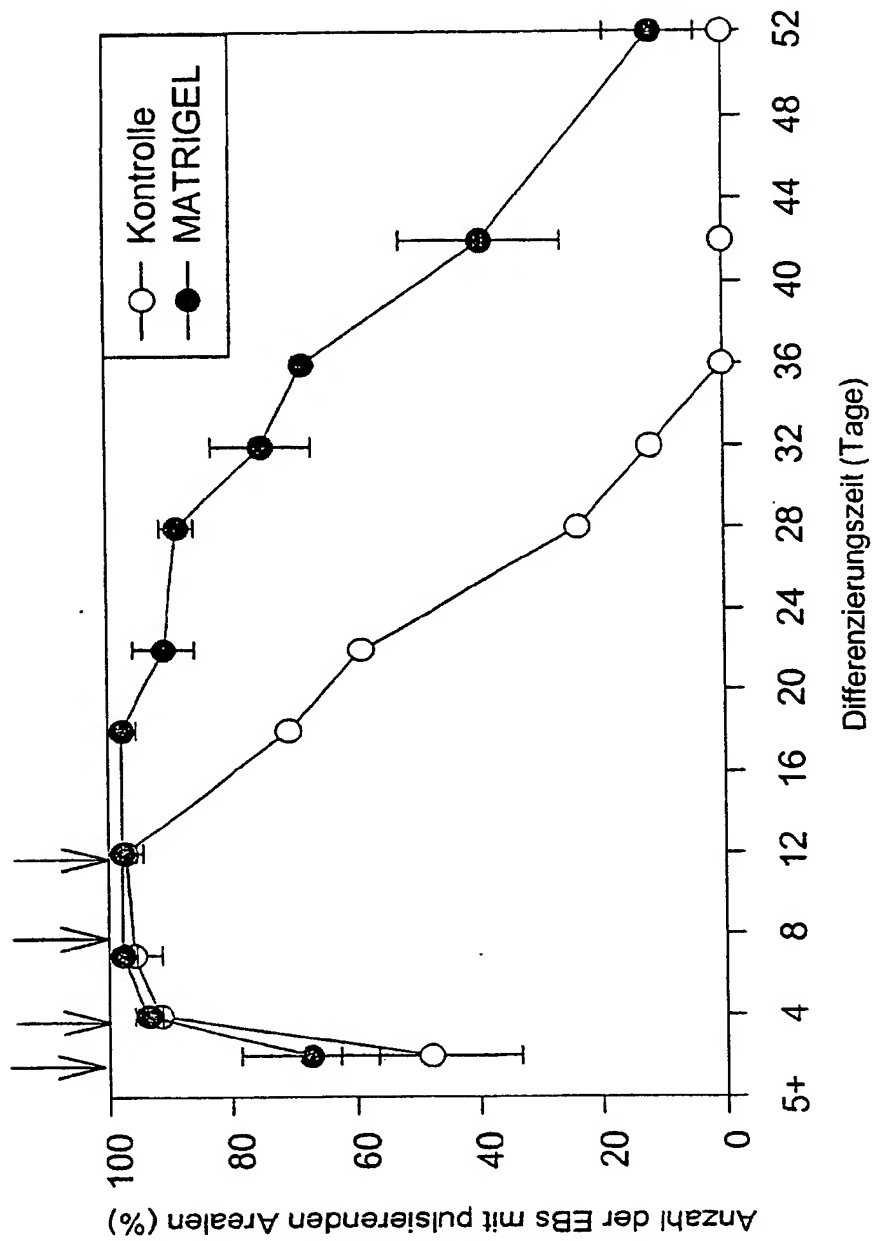


Abb. 2: Differenzierung von spontan pulsierenden Kardiomyozyten: Erhöhung der Rate arrhythmisch kontrahierender Herzzellen durch MATRIGEL- Induktion

BEST AVAILABLE COPY

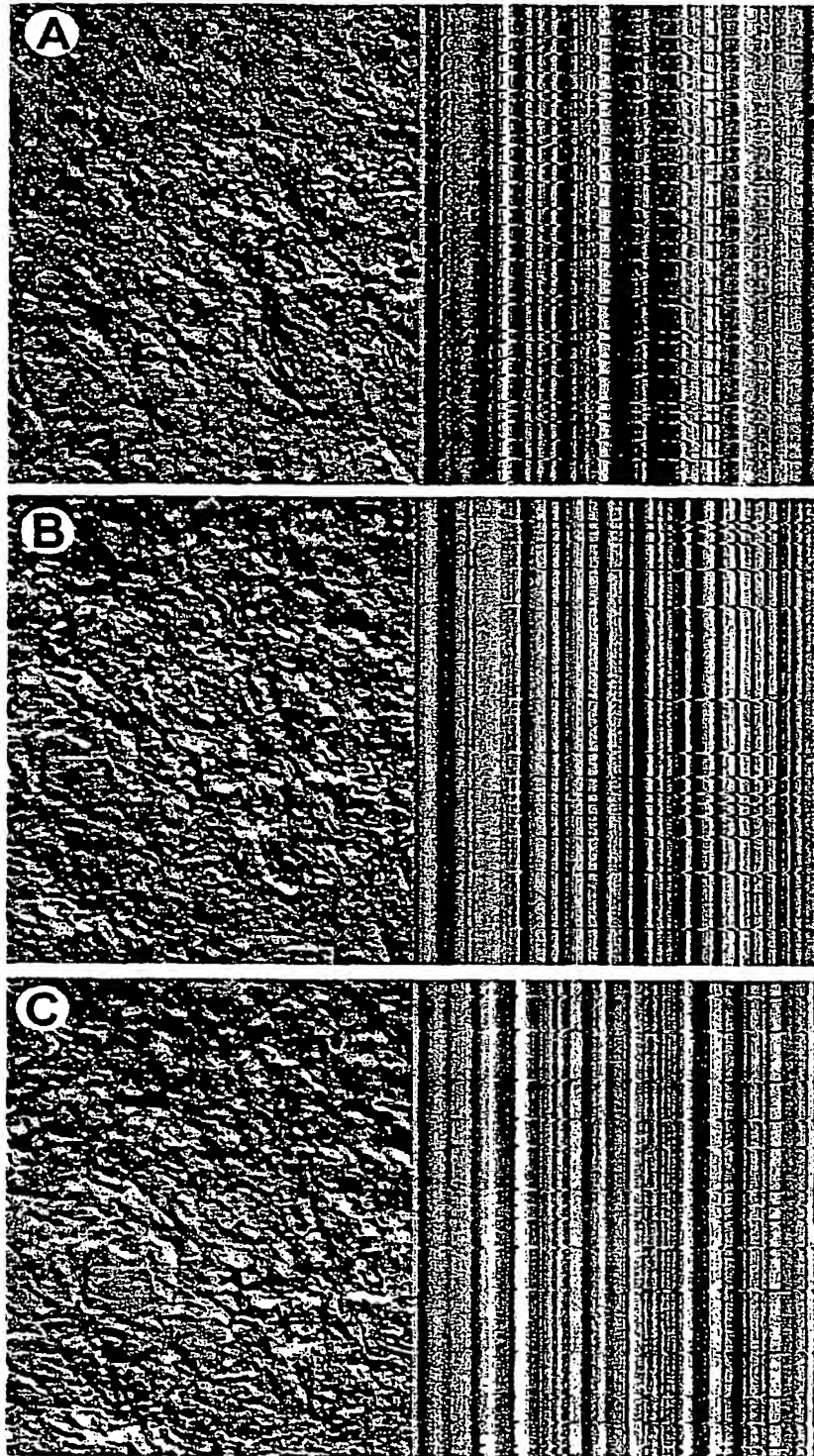


Abb. 3: Muster der Pulsationsfrequenzen von spontan pulsierenden Arealen aus MATRIGEL- behandelten EBs
 A: Pulsationsfrequenzen vor Lidocain-Behandlung
 B: 5×10^{-6} M Lidocain (arrhythmische Pulsationen),
 C: 10^{-5} M Lidocain (partielle Normalisierung der arrhythmischen Pulsationsfrequenzen)

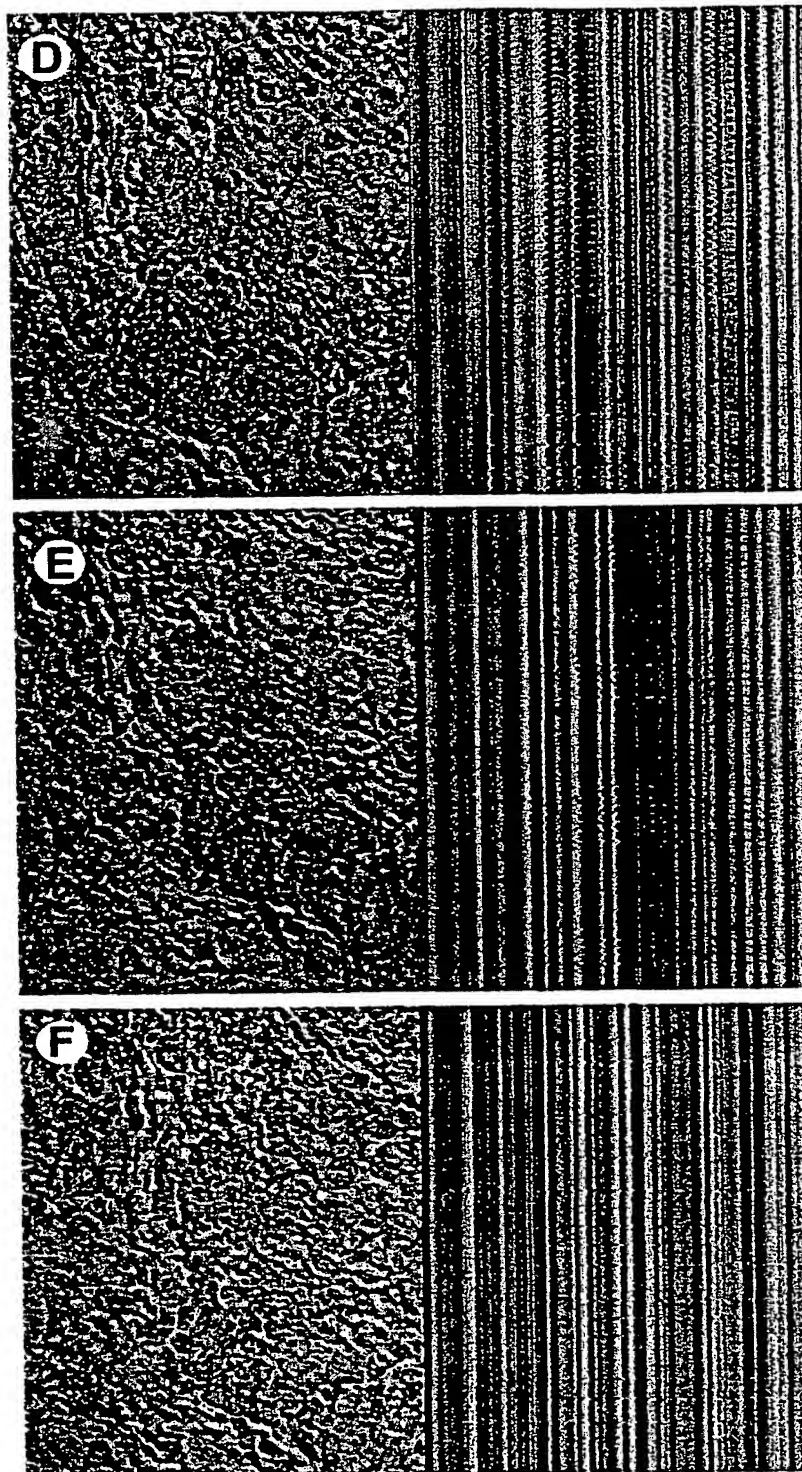


Abb. 4: Muster der Pulsationsfrequenzen von spontan pulsierenden Arealen aus MATRIGEL- behandelten EBs
D: Pulsationsfrequenzen vor Lidocain-Behandlung
E: 5×10^{-4} M Lidocain (arrhythmisch pulsierende Cluster),
F: 10^{-3} M Lidocain (Normalisierung der arrhythmischen Pulsationsfrequenzen)

BEST AVAILABLE COPY

002 012/501